

termine PNEC, instead of 100 used in this study, and the assumption of no removal in WWTP.

Cleuvers<sup>(15)</sup> reported that the PEC/PNEC ratios of atenolol and propranolol were 0.00077 and 0.81, respectively. These ratios were similar to ours determined from the concentration detected outside Japan ( $PEC_{int}$ ). However, the ratio for propranolol was two to three orders of magnitude higher than our result predicted from annual consumption and detected concentration in Japan. Ferrari *et al.*<sup>(13)</sup> determined the PEC/PNEC ratio on the basis of the concentration of pharmaceuticals in WWTP effluent in France and Italy. They reported that the maximum ratios for carbamazepine and propranolol were 2.4 and 104, respectively; both are much larger than 1, which requires further detailed investigation. These much higher values were mainly attributed to the usage of maximum concentration (extremely higher than the median/mean) detected from WWTP effluent in addition to the higher consumption of both compounds in Europe than in Japan. PNEC values for both compounds were also very low because of the strong toxicities of carbamazepine on daphnia reproduction and propranolol on fish reproduction, as reported by Huggett *et al.*<sup>(50)</sup> Another report<sup>(14)</sup> on ibuprofen and mefenamic acid using the effluent concentration of Swiss WWTP showed that the PEC/PNEC ratios are as high as 0.7 and 5.4, respectively. The ratios for surface water were 0.5 and 5, respectively. These values are as much as three orders of magnitude higher than our results. Again, the possible reasons behind the PEC/PNEC ratios that are significantly higher than our results include larger consumption of both compounds in Europe than in Japan and the extremely low PNEC values cited from Stuer-Lauridsen *et al.*<sup>(12)</sup> and ECOSAR for ibuprofen and mefenamic acid, respectively. For other compounds, no report of ecological risk is available.

The maximum PEC/PNEC ratios obtained in this study for surface water were much lower than those obtained by Iwane *et al.*<sup>(22)</sup> except for propranolol, whose higher  $PEC_{intsw}$  was attributed to a particularly high concentration detected from a German river. As presented above, both the absence of removal efficiencies in WWTP and the use of ECOSAR prediction are the reasons behind their severe overestimation.

In this study, we found that the PEC/PNEC ratios for six pharmaceuticals, acetaminophen, carbamazepine, ibuprofen, indomethacin, mefenamic acid, and propranolol were larger than 0.01 and we only conducted conventional acute toxicity tests using fish, daphnia, and green algae. Thus, the results of this study cannot directly guarantee the absence of significant effect on individual aquatic organisms or the whole ecological system. Pharmaceutical compounds are designed to have certain physiological activities in specific organs in human beings, and chronic effects such as reproduction inhibition<sup>(50)</sup> or endocrine disruption<sup>(52)</sup> might occur at very low concentrations. In addition to chronic tests such as fish early-life stage toxicity test (*e.g.*, OECD test guideline 210 or equivalent) and daphnia reproduction test (*e.g.*, OECD test guideline 211 or equivalent), endocrine disruption, fish reproduction, immunotoxicity, and neurotoxicity tests might be necessary based on the results of *in vitro* screening tests and on the originally intended physiological effects of the pharmaceuticals.

Furthermore, the large-scale monitoring of pharmaceuticals all over Japan is ongoing as directed by the Public Works Research Institute to understand the current status of contamination in Japan. Once these extensive monitoring data become available, 75 or 90 percentile values should be used for risk assessment instead of maximum values, as presented above. In addition, the efficiency of removal in wastewater treatment needs to be determined to accurately predict the environmental loading of these compounds. The fate of pharmaceuticals not only in the activated sludge process but also in the disinfection process such as chlorination should be revealed. Once these compounds are released into the environment, a risk manage-

ment system needs to be established and the accumulation in sediment, microbial degradation, and photodegradation should also be further investigated because little information is available for these compounds ionized at neutral pH, such as many pharmaceuticals and personal care products.

### Acknowledgements

This work was supported in part by the Japan Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology (MEXT) through the Grant-in-Aid for Young Scientists (B). The authors thank Dr. Kozuki and his research group at the University of Tokushima for the organic carbon measurements.

### References

- 1 Jiho Co. (2005): *Pharma Japan 2005 Handbook*. (in Japanese).
- 2 Daughton, C.D. and Ternes, T.A. (1999): Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change? *Environ. Health Perspect.* **107** (Suppl. 6): 907–938.
- 3 Ternes, T.A. (1998): Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers. *Water Res.* **32**: 3245–3260.
- 4 Halling-Sorensen, B., Nielsen, S.N., Lanzky, P.F., Ingerslev, F., Lützhøft, H.C.H. and Jørgensen, S.E. (1998): Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment – a review. *Chemosphere* **36**: 357–394.
- 5 EU-POSEIDON Project, Eds. Ternes, T. (2006): Detailed report related to the overall duration. <http://poseidon.bafg.de/servlet/is/2884/> (accessed October 27, 2006).
- 6 European Agency for the Evaluation of Medical Products (2006): *Guideline on the environmental risk assessment of medicinal products for human use*. <http://www.emea.eu.int/pdfs/human/swp/444700en.pdf> (accessed October 27, 2006).
- 7 Huschek, G., Hansen, P.D., Maurer, H.H., Krengel, D. and Kayser, A. (2004): Environmental risk assessment of medicinal products for human use according to European Commission recommendation. *Environ. Toxicol.* **19**: 226–240.
- 8 Kolpin, D.W., Furlong, E.T., Meyer, M.T., Thurman, E.M., Zaugg, S.D., Barber, L.B. and Buxton, H.T. (2002): Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999–2000: A national reconnaissance. *Environ. Sci. Technol.* **36**: 1202–1211.
- 9 Brooks, B.W., Chambliss, C.K., Stanley, J.K., Ramirez, A., Banks, K.E., Johnson, R.D. and Lewis, R.J. (2005): Determination of select antidepressants in fish from an effluent-dominated stream. *Environ. Toxicol. Chem.* **24**: 464–469.
- 10 USEPA National Center for Environmental Research (2005): Workshop on pharmaceuticals in the environment. [http://es.epa.gov/ncer/publications/meetings/drinking\\_aug23-25\\_03.html](http://es.epa.gov/ncer/publications/meetings/drinking_aug23-25_03.html) (accessed October 27, 2006).
- 11 Fent, K., Weston, A.A. and Caminada, D. (2006): Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquat. Toxicol.* **76**: 122–159.
- 12 Stuer-Lauridsen, F., Birkved, M., Hansen, L.P., Holten Lützhøft, H.-C. and Halling-Sørensen, B. (2000): Environmental risk assessment of human pharmaceuticals in Denmark after normal therapeutic use. *Chemosphere* **40**: 783–793.
- 13 Ferrari, B., Mons, R., Vollat, B., Fraysse, B., Paxéus, N., Lo Giudice, R., Pollio, A. and Garric, J. (2004): Environmental risk assessment of six human pharmaceuticals: are the current environmental risk assessment procedures sufficient for the protection of the aquatic environment? *Environ. Toxicol. Chem.* **23**: 1344–1354.
- 14 Tauxe-Wuersch, A., De Alencastro, L.F. Grandjean, D. and Tarradellas, J. (2005): Occurrence of several acidic drugs in sewage treatment plants in Switzerland and risk assessment. *Water Res.* **39**: 1762–1771.
- 15 Cleuvers, M. (2005): Initial risk assessment for three  $\beta$ -blockers found in the aquatic environment. *Chemosphere* **59**: 199–205.
- 16 Schwab, B.W., Hayes, E.P., Fiori, F.M., Mastrocco, F.J., Roden, N.M., Cragin, D., Meyerhoff, R.D., D'Aco, V.J. and Anderson, P.D. (2005): Human pharmaceuticals in US surface waters: A human health risk assessment. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **42**: 296–312.

- 17 Shimazaki, D. (2006): Latest issues on fate of pharmaceuticals in the aquatic environment. *J. Japan Soc. Wat. Environ.* **29**: 186–204. (in Japanese).
- 18 Seino, A., Furusho, S. and Masunaga, S. (2004): Occurrence of pharmaceuticals used in human and veterinary medicine in aquatic environments in Japan. *J. Jpn. Soc. Water Environ.* **27**: 685–691. (in Japanese).
- 19 Nakada, N., Tanishima T., Shinohara, H., Kiri, K. and Takada, H. (2006): Pharmaceuticals chemical and endocrine disrupters in municipal wastewater in Tokyo and their removal during activated sludge treatment and ozonation. *Water Res.* **40**: 3293–3303.
- 20 Ishibashi, H., Matsumura, N., Hirano, M., Matsuoka, M., Shiratsuchi, H., Ishibashi, Y., Takao, Y. and Arizono, K. (2004): Effects of triclosan on the early life stages and reproduction of medaka *Oryzias latipes* and induction of hepatic vitellogenin. *Aquat. Toxicol.* **67**: 167–179.
- 21 Yasojima, M., Yamashita, N., Nakada, N., Komori, K., Suzuki Y. and Tanaka H. (2004): Development of analytical method for levofloxacin and clarithromycin in secondary effluent and their adverse effects on algal growth. *J. Jpn. Soc. Wat. Environ.* **27**: 707–714. (in Japanese).
- 22 Iwane, T. (2004): In: *Final report of the study on the evaluation method of the effects of pharmaceuticals on the environment, H15-Special-039*. Ministry of Health, Labor, and Welfare, Japan. (in Japanese).
- 23 Escher, B.I. and Schwarzenbach, R.P. (1996): Partitioning of substituted phenols in liposome-water, biomembrane-water, and octanol-water systems. *Environ. Sci. Technol.* **30**: 260–270.
- 24 Nakamura, Y., Yamamoto, H., Sekizawa, J., Kondo, T., Hirai, N. and Tatarazako, N.: Bioaccumulation and acute toxicity of fluoxetine for Japanese medaka (*Oryzias latipes*): effects of pH. *Chemosphere* (under review).
- 25 Japan Ministry of Health, Labor and Welfare. (2004): *Survey of Pharmaceutical Industry Productions, Fiscal Year 2003*. Jiho Co., Tokyo, Japan. (in Japanese).
- 26 Mizushima, Y. (Ed.) (2005): *Today's Drug 2005*. Nankodo, Co., Tokyo, Japan.
- 27 Yamamoto, H., Hayashi, A., Nakamura, Y. and Sekizawa, J. (2005): Fate and partitioning of selected pharmaceuticals in aquatic environment. *Environ. Sci.* **12**: 347–358.
- 28 OECD (1992): *Fish, acute toxicity test, OECD test guidelines for testing of chemicals No. 203*.
- 29 Japan Society of Environmental Toxicology (2003): *Handbook for testing ecological effects of chemical compounds*. Test Guideline for Chemicals by the Japan Ministry of the Environment. (in Japanese).
- 30 OECD (1984): *Daphnia sp., acute immobilization test and reproduction test, OECD test guidelines for testing of chemicals No. 202*.
- 31 OECD (1984): *Alga, growth test, OECD test guidelines for testing of chemicals No. 201*.
- 32 USEPA (2000): Ecological structure activity relationship (ECOSAR) program version 0.99g. <http://www.epa.gov/opptintr/newchems/tools/21ecosar.htm>.
- 33 Yamamoto, H. and Liljestrand, H.M. (2004): Partitioning of selected estrogenic compounds between synthetic membrane vesicles and water: effects of lipid components. *Environ. Sci. Technol.* **38**: 1139–1147.
- 34 Mueller, P., Chien, T.F. and Rudy, B. (1983): Formation and properties of cell-sized lipid bilayer vesicles. *Biophys. J.* **44**: 375–381.
- 35 Hope, M.J., Bally, M.B., Webb, G. and Cullis, P.R. (1985): Production of large unilamellar vesicles by a rapid extrusion procedure: characterization of size, trapped volume and ability to maintain a membrane potential. *Biochim. Biophys. Acta.* **812**: 55–65.
- 36 OECD (2002): *Manuals for investigation of HPV chemicals, Chap. 4: Initial assessment of data*. <http://www.oecd.org/dataoecd/6/14/2483645.pdf>.
- 37 Japan Ministry of Environment (2005): *Environmental Risk Assessment of Chemicals*. Vol. 4., Chap. 3: Initial Ecological Risk Assessment Guidelines for Chemicals. <http://www.env.go.jp/chemi/report/h17-21/pdf/chpt1/1-2-1.pdf>. (in Japanese).
- 38 Stumpf, M., Ternes, T.A., Haberer, K., Seel, P. and Baumann, W. (1996): Nachweis von Arzneimittelrückständen in Kläranlagen und Fließgewässern. *Vom Wasser* **86**: 291–303.
- 39 Zuccato, E., Calamari, D., Natangelo, M. and Fanelli, R. (2000): Presence of therapeutic drugs in the environment. *Lancet* **355**: 1789–1790.

- 40 Boyd, G.R., Reemtsma, H., Gramm, D.A. and Mitra, S. (2003): Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in surface and treated waters of Louisiana, USA and Ontario, Canada. *Sci. Total Environ.* **311**: 135–149.
- 41 Boyd, G.R., Palmeri, J.M., Zhang, S., Grimm, D.A. (2004): Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in stormwater canals and Bayou St. John in New Orleans, Louisiana, USA. *Sci. Total Environ.* **333**: 137–148.
- 42 Tixier, C., Singer, H.P., Oellers, S. and Müller, S.R. (2003): Occurrence and fate of carbamazepine, clofibrac acid, diclofenac, ibuprofen, ketoprofen, and naproxen in surface waters. *Environ. Sci. Technol.* **37**: 1061–1068.
- 43 Roberts, P.H. and Thomas, K.V. (2006): The occurrence of selected pharmaceuticals in wastewater effluent and surface waters of the lower Tyne catchment. *Sci. Total Environ.* **356**: 143–153.
- 44 Nakada, N., Komori, K. and Suzuki, Y. (2005): Occurrence and fate of anti-inflammatory drugs in wastewater treatment plants in Japan. *Environ. Sci.* **12**: 359–369.
- 45 Takao, Y., Shimazu M., Kohra, S., Nagae, M., Ishibashi, Y., Tahira, Y. and Arizono, K. (2006): Seasonal and diurnal fluctuations in the concentrations of pharmaceutical personal care products (PPCPs) in residential sewage water. *J. Environ. Sci. Health, Part A* (under review).
- 46 Paxeus, N. (2003): Removal of selected NSAIDs, gemfibrozil, carbamazepine,  $\beta$ -blockers, trimethoprim and triclosan in conventional wastewater treatment plants in five EU countries and their discharge to the aquatic environment. *Water Sci. Technol.* **50**: 253–260.
- 47 Castiglioni, S., Bagnati, R., Fanelli, R., Pomati, F., Calamari, D. and Zuccato, E. (2006): Removal of pharmaceuticals in sewage treatment plants in Italy. *Environ. Sci. Technol.* **40**: 357–363.
- 48 Urase, T. and Kikuta, T. (2005): Separate estimation of adsorption and degradation of pharmaceutical substances and estrogens in the activated sludge process. *Water Res.* **39**: 1289–1300.
- 49 Mitsubishi Chemical Safety Inc. (1996): Investigation on latest trend in overseas concerning judgment and checking of chemical compounds in fiscal year 1995. Entrusted by the Japan Ministry of Environment. (in Japanese).
- 50 Huggett, D.B., Brooks, B.W., Peterson, B., Foran, C.M. and Schlenk, D. (2002): Toxicity of select beta adrenergic receptor-blocking pharmaceuticals (b-blockers) on aquatic organisms. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **43**: 229–235.
- 51 Calamari, D., Zuccato, E., Castiglioni, S., Bagnati, R. and Fanelli, R. (2003): Strategic survey of therapeutic drugs in the rivers Po and Lambro in northern Italy. *Environ. Sci. Technol.* **37**: 1241–1248.
- 52 Fent, K., Escher, C. and Caminada, D. (2006): Estrogenic activity of pharmaceuticals and pharmaceutical mixtures in a yeast reporter gene system. *Rep. Toxicol.* **22**: 175–185.
- 53 Iwane, T. (2003): Pharmaceuticals in the aquatic environment. *National Institute for Environmental Studies News* **22**: 12–14. (in Japanese).

## 8

## 非ステロイド系医薬品類の生態リスク評価

徳島大学 山本裕史 中村友紀 木谷智世 中村雄大 関澤純  
 国立環境研究所 鎌迫典久

## Initial Ecological Risk Assessment of Non-steroidal Pharmaceuticals

Univ. of Tokushima Hiroshi YAMAMOTO, Yuki NAKAMURA, Chise KITANI,  
 Yudai NAKAMURA, Jun SEKIZAWA, NIES Norihisa TATARAZAKO

**要旨**：新規の環境微量汚染化学物質として注目される非ステロイド系医薬品類 8 種類を選定し、ヒメダカ、オオミジンコ、単細胞緑藻類を用いて急性毒性試験に加え慢性毒性試験を実施した。この結果から予測無影響濃度(PNEC)を算出し、環境中からの検出濃度報告(MEC)や国内消費量や未変化体排泄率から求められる予測環境中濃度等(PEC)と比較して生態リスク初期評価をおこなった。その結果、国内での PEC(MEC)/PNEC は全て 0.1 未満となり現時点ではリスク評価作業は必要ないに分類されたため、直ちに水生生態系へ影響を与える可能性は低いと考えられる。しかし、acetaminophen 等は海外の MEC との比較によると 0.1 と 1 の間であり、国内での検出データの不十分さや医薬品の生理活性による特異的な慢性影響の可能性があることから、今後より詳細な検討が必要と考えられる。

キーワード：医薬品、ヒメダカ、ミジンコ、生態リスク、慢性毒性

Key Words: Pharmaceuticals, Japanese medaka, daphnia, ecological risk, chronic toxicity

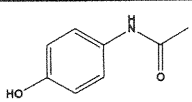
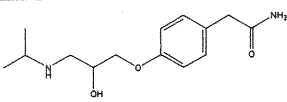
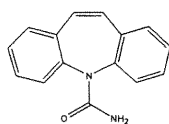
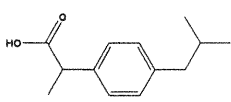
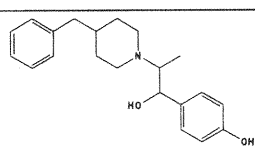
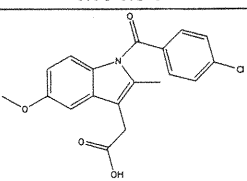
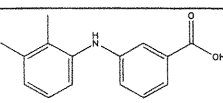
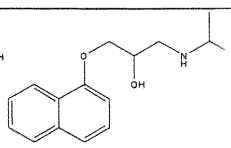
## 1. はじめに

1990 年代後半以降、水環境中に存在して微量で生態系に影響を及ぼす可能性がある物質として、人や家畜が使用する医薬品類が注目されるようになってきた<sup>1-3)</sup>。欧州では POSEIDON プロジェクトによって医薬品類の水環境中濃度やその下水・浄水プロセスにおける除去率の大規模な調査が行われた<sup>4)</sup> ほか、EMA によって環境リスクアセスメントも実施されている<sup>5)</sup>。米国でも USGS による医薬品類の一斉調査<sup>6)</sup>のほか、抗うつ剤が魚体から検出されたという報告<sup>7)</sup>による一般市民の関心の高まりを受け、大規模な環境中医薬品類に関するプロジェクト<sup>8)</sup>が行われてきた。古典的な水生生物に対する急性・慢性毒性試験についても、欧米各国の様々な研究者によって様々な医薬品類を対象に行われ始めており、昨年にはそのレビューが論文として発行されている<sup>9)</sup>。

わが国でも、首都圏を中心に医薬品に関する調査が 2002 年頃から本格化し、下水処理放流水や河川水中から最大 1 µg/L 程度で検出されている<sup>10,11)</sup>。また、最近では全国の 27 の一級河川<sup>12)</sup>や琵琶湖一淀川水系<sup>13)</sup>、近畿圏の下水処理場<sup>14)</sup>を対象とした大規模調査の報告もある。一方で水生生物を対象にした毒性試験については、抗生物質クラリスロマイシン<sup>15)</sup>や抗菌剤トリクロサン<sup>16)</sup>に関する研究例以外は報告が少なく、OECD や環境省が推奨する系統立てた生態リスク評価は実施されていない。岩根ら<sup>17)</sup>は国内消費量の多い 87 物質について試行的な生態・環境リスク初期評価スクリーニングを実施し、優先的に評価が必要な医薬品を 8 物質挙げている。しかし、予測無影響濃度(Predicted No Effect Concentration: PNEC)を求める際に実際の毒性試験結果ではなく主に生態学的構造活性相関(EOcological Structure Activity Relationship: ECOSAR)を用いた推定値を採用している。また、予測環境

中濃度(Predicted Environmental Concentration: PEC)の算出についても国内消費量等を用いた計算値のみを採用しており、実際の国内からの検出濃度(Measured Environmental Concentration: MEC)については情報不足のために利用されていないなど正確性に問題があった。そこで、われわれは岩根らによる試行的スクリーニング結果<sup>17)</sup>のほか、国内の消費量<sup>18)</sup>や検出報告<sup>10-14)</sup>、海外での医薬品の生態リスク初期評価結果<sup>19-21)</sup>などを参考にステロイドホルモン剤や抗生物質を除く非ステロイド系医薬品類8種を選定し、ヒメダカ、オオミジンコ、単細胞緑藻類の3種を用いた急性毒性試験結果からPNECの再計算をおこなってきた<sup>22)</sup>。また、下水処理場における除去効率を推定してPECについても計算し、近年の国内でのMECも考慮して、より正確なリスク初期評価を実施した結果を発表<sup>22)</sup>している。しかし、低濃度での生理活性が想定される医薬品類については古典的な急性毒性試験だけでは不十分であり、世界的にも非常に報告例が少ない低濃度・長時間曝露を想定した慢性毒性試験の結果を踏まえて生態リスクを評価する必要がある。そこで、本報では環境省が実施している化学物質の生態リスク初期評価<sup>23)</sup>を参考にOECDテストガイドラインに準拠してヒメダカとオオミジンコの慢性毒性試験を追加実施し、その結果をもとにPNECを再計算して生態リスク初期評価を実施した結果を報告する。

表1 本研究で使用した医薬品類

項目/医薬品	acetaminophen	atenolol	carbamazepine	ibuprofen
国内年間消費量 <sup>a)</sup>	740 t	5.4 t	45 t	23 t
未変化体排泄率 <sup>b)</sup>	0.9-2.7%	90%	2-3%	<1%
化学構造				
PEC/PNEC報告値 <sup>c)</sup>	0.057	0.7	0.23	0.043
項目/医薬品	ifenprodil	indomethacin	mefenamic acid	propranolol
国内年間消費量 <sup>a)</sup>	8.6 t	52 t	38 t	1.1 t
未変化体排泄率 <sup>b)</sup>	20-30%	64% <sup>d)</sup> 0.08-0.1% <sup>e)</sup>	74%	<1%
化学構造				
PEC/PNEC報告値 <sup>c)</sup>	0.20	0.28	0.65	0.08

<sup>a)</sup>薬事工業動態統計<sup>18)</sup>から引用、<sup>b)</sup>製薬会社の発行する添付文書から引用、<sup>c)</sup>岩根らによる報告<sup>17)</sup>から引用、<sup>d)</sup>服用剤として使用時、<sup>e)</sup>シップ剤として使用時

## 2. 実験方法

### 2.1 使用した非ステロイド系医薬品類

使用した非ステロイド系医薬品類は、表1に示す acetaminophen (解熱鎮痛剤)、atenolol (ベータ

遮断剤), carbamazepine (抗てんかん剤), ibuprofen (非ステロイド系抗炎症剤), ifenprodil tartate (以下 ifenprodil とする: 脳循環代謝剤), indomethacin と mefenamic acid (ともに非ステロイド系抗炎症剤), propranolol (ベータ遮断剤) の 8 種とした. 表にそれぞれの年間消費量の推定値と, 未変化体排泄率, 化学構造等を示す. なお, ここで国内年間消費量は厚生労働省医政局編集の「薬事工業動態統計」<sup>18)</sup> に示されている値をそれぞれの医薬品含有量等を考慮して足し合わせることによって求めた.

## 2.2 毒性試験方法

### 2.2.1 魚類を用いた毒性試験

魚類に対する毒性試験は, 国立環境研究所から分与を受けたヒメダカ(*Oryzias latipes*)を徳島大学内の飼育施設で 2 ヶ月以上馴化・繁殖して用いた. 給餌は 1 日 2 回, ブラインシュリンプ(*Artemia salina*)を与えた. 急性毒性試験は OECD テストガイドライン 203 に準拠して<sup>24)</sup> 半止水式で曝露試験をおこない, 96 時間後に半数致死濃度(LC<sub>50</sub>)を測定した. また, 慢性毒性試験は OECD テストガイドライン 210 に準拠して初期発達段階試験を行い<sup>24)</sup>, 孵化日数, 孵化後 30 日後の全長・体長・湿重量ならびに致死の最大無影響濃度(Maximum NO Effect Concentration: NOEC)を算出した. なお, 水中濃度は島津製作所製の吸光・蛍光検出器付高速液体クロマトグラフィー(HPLC, LC10-AD)を用いて急性試験は試験開始前と終了後, 慢性試験は 1 週間に 1 回以上測定し, 曝露濃度はその測定値の平均値とした.

### 2.2.2 甲殻類を用いた毒性試験

甲殻類に対する毒性試験には, 国立環境研究所から分与を受けたオオミジンコ (*Daphnia magna*)を徳島大学内の飼育施設で 2 ヶ月以上馴化・繁殖して用いた. 給餌は 1 日 1 回行い, 洗浄済みのクロレラ(川上農場から購入)を与えた. 急性毒性試験である遊泳阻害試験は OECD テストガイドライン 202 に準拠して<sup>24)</sup> 止水式で曝露試験をおこない, 48 時間後の遊泳阻害率を調べ, 半数影響濃度(EC<sub>50</sub>)を測定した. 慢性毒性試験は OECD テストガイドライン 211 に準拠して繁殖阻害試験を行い<sup>24)</sup>, 生後 24 時間以内の幼体を 21 日間飼育し, 遊泳阻害と産仔数の NOEC を算出した. なお, 水中濃度については魚類の試験と同様に HPLC で測定し, その平均値を曝露濃度とした.

### 2.2.3 藻類生長阻害試験

藻類に対する毒性試験には国立環境研究所から譲与を受けた単細胞緑藻類 (NIES-35, *Pseudokirchneriella subcapitata*)を徳島大学内の飼育施設で 2 ヶ月以上継代・培養して用いた. OECD テストガイドライン 201 に準拠して<sup>24)</sup>, 照明付インキュベーター内で 100 mL 三角フラスコに入れた AAP 培地内で 96 時間後のブランクに対する成長阻害率を面積法によって算出し, 急性毒性値として EC<sub>50</sub> を, 慢性毒性値として NOEC を測定した. なお, 曝露濃度は HPLC で測定した初期濃度とした.

### 2.2.4 ECOSAR を用いた予測

毒性予測値は USEPA から無料でダウンロード可能な EPI Suite 中の ECOSAR v0.99h を用いて, 無機物や界面活性剤など以外の「その他の物質」として対象とした医薬品類 8 種について計算をおこなった. このソフトを用いることによって, 魚類の 96h-LC<sub>50</sub>, ミジンコ類の 48h-LC<sub>50</sub>, 緑藻類の 96h-EC<sub>50</sub> や ChV (NOEC と最小影響濃度 LOEC の幾何平均値)などを算出することができる.

## 2.3 生態リスク初期評価手法

PNEC (予測無影響濃度)の算出には急性毒性試験の EC<sub>50</sub> もしくは LC<sub>50</sub>, さらに慢性試験の NOEC

をアセスメント係数で割ることによって求められる。ここでは、環境省の「化学物質の環境リスク初期評価ガイドライン」<sup>23)</sup>をもとにアセスメント係数を設定した(表2)。つまり、急性毒性については異なる種族の水生生物3種のデータがあるので、EC<sub>50</sub>もしくはLC<sub>50</sub>の最小値をアセスメント係数100で除したもの(PNEC<sub>acute</sub>)を求めた。慢性毒性についても同様に3種のデータがあるのでNOECの最小値を10で除したもの(PNEC<sub>chronic</sub>)を求めた。なお、ECOSARでの予測値をもとにしたPNEC<sub>ECOSAR</sub>についても、同様にアセスメント係数を設定して求めた。PEC(予測環境中濃度)は年間国内消費量、未変化体排泄率(1%未満のものは1%とした)、年間国内下水量、活性汚泥による除去率(1%未満のものは1%とした)により下水放流水濃度を予測し(PEC<sub>domSTP</sub>)<sup>22)</sup>、さらには希釈率として排出基準と環境基準の考えに基づき10で割ることによって求めた(PEC<sub>domSW</sub>)<sup>22)</sup>。また、国内外の検出濃度(MEC)の報告があるものについては下水放流水、河川水に分けて用いた。このように算出したPEC(もしくはMEC)とPNECからPEC(MEC)/PNECを算出した。環境省の「化学物質の環境リスク初期評価ガイドライン」<sup>23)</sup>によると、表3に示すようにPEC/PNECが0.1を超えた物質についてはさらなる環境影響評価作業が必要とされている。

表2 PNECを算出するためのアセスメント係数<sup>23)</sup>

収集可能な情報	推奨されるアセスメント係数
急性毒性試験による(魚類, ミジンコ, 藻類のうち)1もしくは2種に対するLC <sub>50</sub> /EC <sub>50</sub>	1000
急性毒性試験による3種(通常は魚類, ミジンコ, 藻類)に対するLC <sub>50</sub> /EC <sub>50</sub>	100
慢性毒性試験による(魚類, ミジンコ, 藻類のうち)1もしくは2種に対するNOEC	100
慢性毒性試験による3種(通常は魚類, ミジンコ, 藻類)に対するNOEC	10

表3 環境省による化学物質の環境リスク初期評価基準<sup>23)</sup>

PEC/PNEC	評価
PEC/PNEC < 0.1	現時点ではそれ以上の作業は必要ないと考えられる
0.1 ≤ PEC/PNEC < 1	情報収集に努める必要があると考えられる
1 ≤ PEC/PNEC	詳細な評価を行う候補と考えられる

表4 魚類, 甲殻類, 藻類を用いた急性毒性試験の結果<sup>22)</sup>

	ヒメダカ 96h-LC <sub>50</sub>	オオミジンコ 48h-EC <sub>50</sub>	単細胞緑藻類 96h-EC <sub>50</sub>
acetaminophen	800 (258)	17 (41)	2070 (2550)
atenolol	1790 (1460)	180 (83)	140 (78)
carbamazepine	20 (102)	55 (111)	64 (70)
ibuprofen	89 (32)	31 (39)	56 < (27)
ifenprodil	4.4 (3.2)	4.1 (2.9)	1.8 (3.4)
indomethacin	44 (21)	22 (27)	33 (19)
mefenamic acid	3.6 (1.5)	10 (2.0)	17 (1.5)
propranolol	9.6 (30)	2.7 (2.3)	<b>0.70 (5.5)</b>

単位は mg/L, カッコ内は ECOSAR 予測値 (ただしヒメダカは魚類 96h-LC<sub>50</sub>, オオミジンコはミジンコ 48h-EC<sub>50</sub>, 単細胞緑藻類は藻類 96h-EC<sub>50</sub>)。太字は実測値/ECOSAR 予測値が 0.5 以下, 斜体字は実測値/ECOSAR 予測値が 2 以上

### 3. 毒性試験結果

#### 3.1 急性毒性試験

表4にヒメダカ, オオミジンコ, 単細胞緑藻類を用いた急性毒性試験の結果と, ECOSARによる予測結果を合わせて示す。ECOSARの予測値との差はほぼ1オーダー(0.1倍と10倍の間)以内であった。ifenprodil, mefenamic acid, propranololの3種が他の5種に比べて毒性が強く, 特にpropranolol



は藻類とミジンコに対して、mefenamic acid と ifenprodil はメダカに対して 1~10 mg/L のレベルで急性毒性が見られた。残りの 5 種類のうち atenolol については 100 mg/L 以上と急性毒性については比較的弱く、ibuprofen についても水溶解度である 100 mg/L 程度で急性毒性がみられた。acetaminophen は、ミジンコの EC<sub>50</sub> がメダカや藻類に比べて 2 オーダー低く、オオミジンコや甲殻類に対する特異的な毒性が示唆された。なお、他の研究者での報告がある carbamazepine や propranolol の 3 種に対する急性毒性試験結果<sup>19)</sup>、atenolol や ibuprofen の藻類とミジンコに対する急性毒性試験結果<sup>20)</sup>、acetaminophen の急性毒性試験結果<sup>21)</sup>と比較すると全てその差は 1 オーダー以内でほぼ一致していた。

表5 魚類, 甲殻類, 藻類を用いた慢性毒性試験の結果

	ヒメダカ 30d-NOEC	オオミジンコ 21d-NOEC	単細胞緑藻類 <sup>22)</sup> 96h-NOEC
acetaminophen	180 (41)	0.14 (28)	550 (94)
atenolol	270 (NA)	0.83 (NA)	10 (11)
carbamazepine	6.3 (14)	2.7 (16d-EC <sub>50</sub> : 6.4)	6.4 (8.1)
ibuprofen	15 (5.5)	9.7 (16d-EC <sub>50</sub> : 4.3)	2.0 (7.5)
ifenprodil	0.046 (0.47)	0.94 (0.35)	0.18 (1.0)
indomethacin	8.5 (3.9)	0.59 (16d-EC <sub>50</sub> : 3.6)	0.84 (6.9)
mefenamic acid	0.35 (0.32)	1.5 (16d-EC <sub>50</sub> : 0.43)	2.5 (1.0)
propranolol	4.2< (NA)	0.066 (NA)	0.10 (1.4)

単位は mg/L, カッコ内は ECOSAR 予測値 (ただしヒメダカは魚類 30d-ChV, オオミジンコはミジンコ 21d-ChV, 単細胞緑藻類は藻類 96h-ChV), NA はデータなし, 太字は実測値/ECOSAR 予測値が 0.5 以下, 斜体字は実測値/ECOSAR 予測値が 2 以上

### 3.2 慢性毒性試験

次に表5にヒメダカ, オオミジンコ, 単細胞緑藻類を用いた慢性毒性試験の結果を示す。ここで、メダカについては孵化日数よりも 30 日後の体長・致死率等のエンドポイントの方が低濃度で影響がみられたことからその最小値を 30d-NOEC とし、ミジンコについては遊泳阻害よりも累積産仔数の方が低濃度で影響がみられたことから産仔数の 21d-NOEC を記した。ifenprodil のメダカや propranolol のミジンコや藻類については 0.1 mg/L 以下の比較的強い毒性を示した。propranolol については魚類生殖毒性が 0.5 µg/L でみられたという報告<sup>25)</sup>に比べると、本研究で実測した毒性は弱かった。急性毒性試験と同様に acetaminophen はミジンコに対して毒性が強く、甲殻類に特有の影響を及ぼした可能性がある。atenolol の急性毒性値は全て 100 mg/L 以上と非常に高かったが、ミジンコの慢性値は 1 mg/L を下回るなど一部について急性と慢性毒性に大きな差が見られた。急性毒性値と慢性毒性値の比が acetaminophen, atenolol の甲殻類および ifenprodil の魚類ではアセスメント係数で想定される 10 を大きく上回った。それ以外においても、10 程度もしくはそれ以上となる傾向がみられたため、急性毒性試験によるスクリーニング後、慢性影響を考慮した生態リスク評価を行う必要があると考えられる。

### 4. 生態リスク初期評価

最後に、これまでの試験結果を総合して生態リスク初期評価を行うため、PEC<sub>domSTP</sub> と PEC<sub>domSW</sub> を算出し、国内の下水放流水<sup>10,11,14,26)</sup>(MEC<sub>domSTP</sub>)、河川水<sup>11-13)</sup>(MEC<sub>domSW</sub>)、海外の下水放流水<sup>2,27-31)</sup>(MEC<sub>overseaSTP</sub>)、河川水<sup>2,6,29-31)</sup>(MEC<sub>domSW</sub>)の最大検出濃度の計 6 種類の値を表6に示す。河川水のデータがないものについては、下水放流水の濃度を単純に 10 分の 1 して算出した。表6に示すよ

うに PEC や MEC はその方法によって大きく異なり、概して  $MEC_{overseaSTP}$  が最も高かった。また、国内の PEC と MEC はほぼ一致しており、予測計算にある程度の精度があると推測される一方で、MEC については最大濃度では下水処理場の処理効率や自然条件が極端な異常値が採用されるといふ懸念がある。そのため、十分な量のデータを収集し、中央値や75%もしくは90%値を収集していく必要がある。

表6 対象物質の予測環境中濃度と環境中最大検出濃度 ( $\mu\text{g/L}$ )<sup>22)</sup>

	$PEC_{domSTP}$	$PEC_{domSW}$	$MEC_{domSTP}$	$MEC_{domSW}$	$MEC_{overseaSTP}$	$MEC_{overseaSW}$
acetaminophen	0.071	0.0071	0.025	0.0025	6.2	1.3
atenolol	0.27	0.027	0.00078	0.000078	ND	0.027
carbamazepine	0.10	0.0096	0.45	0.050	2.1	0.36
ibuprofen	0.0034	0.00034	0.18	0.018	1.3	0.29
ifenprodil	0.042	0.0042	0.0021	0.00021	ND	ND
indomethacin	1.4	0.14	0.19	0.019	0.60	0.20
mefenamic acid	0.52	0.052	0.35	0.035	4.5	0.45
propranolol	0.00037	0.000037	0.016	0.0093	0.37	0.10

次に、毒性試験の結果から算出した  $PNEC_{exp}$  と ECOSAR 予測値を用いた  $PNEC_{ECOSAR}$  の値、そしてそれぞれの値の比を表7に示す。表からわかるように、carbamazepine を除く7物質については  $PNEC_{acute}$  よりも  $PNEC_{chronic}$  の方が低く、アセスメント係数が10倍異なるにもかかわらず慢性毒性が強い物質が多かった。一方、 $PNEC_{exp}/PNEC_{ECOSAR}$  が mefenamic acid 以外の7物質について1未満になり、ECOSAR の過小評価が指摘されたものの、0.1を下回るものはなかった。

表7 対象物質の予測無影響濃度 ( $\mu\text{g/L}$ )

	$PNEC_{acute}$	$PNEC_{chronic}$	$PNEC_{exp}$	$PNEC_{ECOSAR}$	$PNEC_{exp}/PNEC_{ECOSAR}$
acetaminophen	170	14	14	110	0.13
atenolol	1400	83	83	110	0.75
carbamazepine	200	270	200	640	0.31
ibuprofen	310	200	200	270	0.74
ifenprodil	18	4.6	4.6	5.5	0.84
indomethacin	220	59	59	190	0.31
mefenamic acid	36	35	35	15	2.33
propranolol	7.0	6.6	6.6	14	0.47

最後に表6と表7に示す6通りの PEC もしくは MEC と実験によって求めた  $PNEC_{exp}$  をもとに生態リスク評価に用いる  $PEC(MEC)/PNEC$  比を求めた。その結果を図1に示す。国内についての  $PEC(MEC)/PNEC$  比は岩根らが試行的スクリーニングで算出した値<sup>17)</sup>に比べて全ての物質について低く0.1を下回った。acetaminophen と mefenamic acid については海外の下水放流水では0.1を超える場合もあり、国内での下水放流水や河川水の濃度に関する報告が十分とはいえ、表3の判断基準に照らし合わせてみても、今後全国での調査を進めるなど詳細な検討が必要とされる。その他の6物質については現時点では水生生物に対して直ちに影響を及ぼすレベルにあるとはいえない。

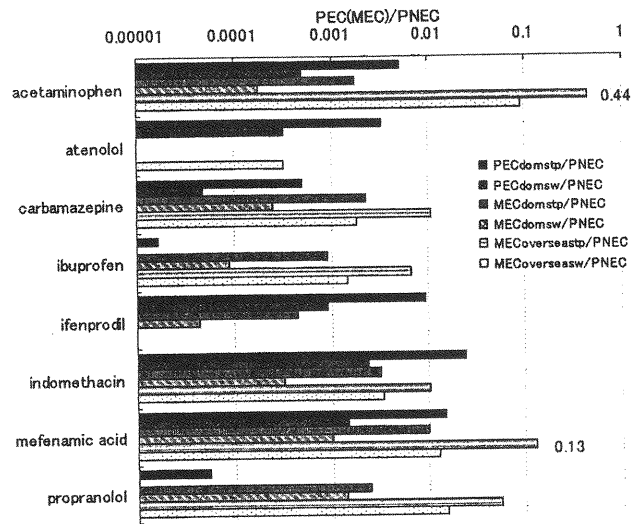


図1 非ステロイド系医薬品類 8 種の生態リスク初期評価結果

医薬品類の PEC(MEC)/PNEC を求めた海外の研究例は、ドイツの Cleuvers<sup>19)</sup>によると atenolol で 0.00077 とほぼ同程度、 propranolol で 0.81 と本研究結果の方が 2 から 3 オーダー程度低かった。ドイツとフランスの下水処理場放流水をもとに評価した Ferrari ら<sup>20)</sup>によると carbamazepine で最大 2.4、 propranolol で最大 104 と 1 をはるかに超えている。欧州での両物質の使用量が多いこと、下水の放流水の最大値をもとに評価していること、 carbamazepine はミジンコの繁殖阻害、 propranolol は前出の Huggett ら<sup>25)</sup>の魚類繁殖阻害が非常に低い濃度で生じていることが原因として考えられる。スイスの下水放流水を用いた ibuprofen の評価<sup>27)</sup>では 0.9 と本研究の値とは 3 オーダーの差がある。これは主に ibuprofen の消費量の差のほか、使用している PNEC が 5 μg/L と低いことも原因として考えられる。

生理活性があるようにデザインされている医薬品類は、繁殖毒性や内分泌かく乱、遺伝毒性といった慢性影響が低濃度で起こる可能性もあり、in vitro のスクリーニング試験結果を踏まえて検討する必要がある。また、PEC や MEC については欧米並みの大規模モニタリングの実施はもちろんのこと、下水処理場での挙動・除去効率の正確な推定や、いったん環境中に排出された後の底質、NOM への収着、光分解、生分解についても把握し、総合的な環境リスク管理体制の構築が望まれる。

### 5. 結論

非ステロイド系医薬品類 8 物質についてヒメダカ、オオミジンコ、単細胞緑藻類の 3 種を用いて急性・慢性毒性試験を実施した結果、国内の PEC(MEC)/PNEC は全て 0.1 以下となり、直ちに水生生態系に影響を及ぼすとは考えにくい。しかし、海外の MEC/PNEC が acetaminophen と mefenamic acid で 0.1 を上回ったため、今後費用対効果に応じてより詳細な検討を要する。

謝辞 本研究は文科省科研費補助金（課題番号 17710046）の助成を受けて行ったものである。

### 参考文献

- 1) Daughton, C. D., Ternes, T.A (1999): Pharmaceuticals and personal care products in the environmental: agents

- of subtle change? *Environ. Health Persp.* 107: suppl. 6, 907-938.
- 2) Ternes, T. A. (1998): Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers. *Wat. Res.* 32: 3245-3260.
  - 3) Halling-Sorensen, B. et al. (1998): Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment – a review, *Chemosphere*, 36: 357-394.
  - 4) EU-POSEIDON Project, eds. Ternes, T. (2006): Detailed report related to the overall duration. (<http://poseidon.bafg.de/servlet/is/2884/>)
  - 5) European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (2006): Guideline on the environmental risk assessment of medicinal products for human use. (<http://www.emea.eu.int/pdfs/human/swp/444700en.pdf>)
  - 6) Kolpin, D. W. et al. (2002): Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999-2000: A national reconnaissance. *Environ. Sci. Technol.* 36: 1202-1211.
  - 7) Brooks, B. W. et al. (2005): Determination of select antidepressants in fish from an effluent-dominated stream. *Environ. Toxicol. Chem.* 24: 464-469.
  - 8) USEPA National Center for Environmental Research (2005): Workshop on pharmaceuticals in the environment. ([http://es.epa.gov/ncer/publications/meetings/drinking\\_aug23-25\\_03.html](http://es.epa.gov/ncer/publications/meetings/drinking_aug23-25_03.html))
  - 9) Fent K. et al. (2006): Ecotoxicology of human pharmaceuticals, *Aquat. Toxicol.*, 76: 122-159.
  - 10) 谷津利勝, 高田秀重(2003):医薬品起源化学物質の下水処理過程における挙動, 第37回日本水環境学会年会講演集, 343.
  - 11) 清野敦子ほか(2004):わが国の水環境中における人用・動物用医薬品の存在, 水環境学会誌, 27, 685-691.
  - 12) 桐賢太郎ほか (2006): 水環境中における合成医薬品の動態—河川における分布と河口域における挙動, 第15回環境化学討論会講演要旨集, 188-189.
  - 13) 長尾亮治ほか(2005): 淀川水系における医薬品の検出, 第42回環境工学研究フォーラム講演集, 40-41.
  - 14) 小林義和ほか(2005): 下水処理場における医薬品の動態, 第42回環境工学研究フォーラム講演集, 42-44.
  - 15) 八十島誠ほか(2004): 下水処理水中に含まれるレボフロキサシン, クラリスロマイシンの分析と藻類生長への影響, 水環境学会誌, 27, 707-714.
  - 16) Ishibashi, H. et al. (2004): Effects of triclosan on the early life stages and reproduction of medaka *Oryzias latipes* and induction of hepatic vitellogenin, *Aquat. Toxicol.*, 67: 167-179.
  - 17) 岩根泰蔵(2004): 医薬品の環境影響評価法に関する研究, 厚生労働省科学技術研究費補助金(研究代表: 井上達), H15-特別-039, 平成15年度最終報告書.
  - 18) 厚生労働省医政局編(2004): 薬事工業動態統計年報平成15年度版, じほう.
  - 19) Cleuvers, M. (2005): Initial risk assessment for three  $\beta$ -blockers found in the aquatic environment, *Chemosphere*, 59: 199-205.
  - 20) Ferrari, B. et al. (2004): Environmental risk assessment of six human pharmaceuticals: are the current environmental risk assessment procedures sufficient for the protection of the aquatic environment?, *Environ. Toxicol. Chem.*, 23, 1344-1354.
  - 21) Stuer-Lauridsen, F. et al. (2000): Environmental risk assessment of human pharmaceuticals in Denmark after normal therapeutic use, *Chemosphere*, 40: 783-793.
  - 22) Yamamoto, H. et al. (2007): Initial ecological risk assessment of eight human pharmaceuticals in Japan, *Environ. Sci.*, in press.
  - 23) 環境省(2007): 化学物質の環境リスク初期評価(<http://www.env.go.jp/chemi/risk/index.html>).
  - 24) 日本環境毒性学会編 (2004): 生態影響試験ハンドブック-化学物質の環境リスク評価-, 朝倉書店.
  - 25) Huggett, D. B. et al. (2002): Toxicity of select beta adrenergic receptor-blocking pharmaceuticals ( $\beta$ -blockers) on aquatic organisms, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 43, 229-235.
  - 26) Nakada N. et al. (2006): Pharmaceuticals chemical and endocrine disrupters in municipal wastewater in Tokyo and their removal during activated sludge treatment and ozonation, *Wat. Res.*, 40: 3293-3303.
  - 27) Tauxe-Wuersch, A. et al. (2005): Occurrence of several acidic drugs in sewage treatment plants in Switzerland and risk assessment, *Wat. Res.*, 39: 1762-1771.
  - 28) Huschek, G. et al. (2004): Environmental risk assessment of medicinal products for human use according to European Commission recommendation, *Environ. Toxicol.*, 19: 226-240.
  - 29) Roberts, P. H., Thomas, K. V. (2006): The occurrence of selected pharmaceuticals in wastewater effluent and surface waters of the lower Tyne catchment, *Sci. Total Environ.*, 356: 143-153.
  - 30) Paxeus, N. (2003): Removal of selected NSAIDs, gemfibrozil, carbamazepine,  $\beta$ -blockers, trimethoprim and triclosan in conventional wastewater treatment plants in five EU countries and their discharge to the aquatic environment. *Wat. Sci. Technol.* 50: 5, 253-260.
  - 31) Zuccato, E. et al. (2000): Presence of therapeutic drugs in the environment, *The Lancet*, 355: 1789-1790.

